

· 合成生物技术 ·

# 若干裂解基因盒子的表征及应用

付生伟<sup>1</sup>, 金帆<sup>2\*</sup>

1 中国科学技术大学 合肥微尺度物质科学国家研究中心, 安徽 合肥 230026

2 中国科学院深圳先进技术研究院 合成生物学研究所 定量生物学研究中心, 广东 深圳 518055

付生伟, 金帆. 若干裂解基因盒子的表征及应用[J]. 生物工程学报, 2023, 39(3): 1142-1162.

FU Shengwei, JIN Fan. Characterization and application of several lysis cassettes[J]. Chinese Journal of Biotechnology, 2023, 39(3): 1142-1162.

**摘要:** 裂解作为合成生物学中的常见功能模块单元, 在基因线路设计方面具有广泛的运用。裂解主要通过诱导表达噬菌体的裂解基因盒子实现, 不过, 尚未有关于裂解基因的详细表征。本研究首先利用阿拉伯糖和鼠李糖诱导系统在大肠杆菌(*Escherichia coli*) Top10 表达了 5 种裂解基因盒子 ( $S_{105}$ ,  $A52G$ ,  $C51S S76C$ ,  $LKD$ ,  $LUZ$ ), 通过  $OD_{600}$  值的测量, 表征了在不同生长阶段、诱导剂浓度、质粒拷贝数等条件下, 含有不同裂解基因盒子的大肠杆菌菌株 Top10 的裂解行为。结果表明, 虽然 5 种裂解基因盒子在大肠杆菌内都可以有效引起宿主的裂解, 但是裂解行为在不同条件下有较大差异。进一步地, 由于诱导系统在不同宿主之间背景表达水平的差异, 导致在铜绿假单胞菌 (*Pseudomonas aeruginosa*) PAO1 中难以构建可诱导的裂解系统。经过筛选, 通过基因组插入的方式, 利用鼠李糖诱导系统对裂解基因盒子在铜绿假单胞菌中引起的裂解行为进行表征。结果显示,  $LUZ$  和  $LKD$  具有较强的使铜绿假单胞菌裂解的能力, 而  $S_{105}$ 、 $A52G$ 、 $C51S S76C$  对铜绿假单胞菌的裂解能力较差。最后, 利用  $LUZ$  和光遗传学工具 BphS, 通过调整核糖体结合位点(ribosome binding site, RBS)的强度, 构建了可在指定表面黏附并裂解的工程菌 Q16, 该菌株具有应用于表面修饰的巨大潜力。

**关键词:** 裂解基因盒子; 诱导系统; 合成生物学; 光遗传学; 表面修饰

资助项目: 国家重点研发计划(2020YFA0906900, 2018YFA0902700); 中国科学院科研仪器设备研制项目(YJKYYQ20200033)  
This work was supported by the National Key Research and Development Program of China (2020YFA0906900, 2018YFA0902700) and the Scientific Instrument Developing Project of the Chinese Academy of Sciences (YJKYYQ20200033).

\*Corresponding author. Tel: +86-755-26409621, E-mail: fan.jin@siat.ac.cn

Received: 2022-09-22; Accepted: 2022-11-28; Published online: 2023-02-17

# Characterization and application of several lysis cassettes

FU Shengwei<sup>1</sup>, JIN Fan<sup>2\*</sup>

1 Hefei National Research Center for Physical Sciences at the Microscale, University of Science and Technology of China, Hefei 230026, Anhui, China

2 CAS Key Laboratory of Quantitative Engineering Biology, Shenzhen Institute of Synthetic Biology, Shenzhen Institutes of Advanced Technology, Chinese Academy of Sciences, Shenzhen 518055, Guangdong, China

**Abstract:** Lysis is a common functional module in synthetic biology and is widely used in genetic circuit design. Lysis could be achieved by inducing expression of lysis cassettes originated from phages. However, detailed characterization of lysis cassettes hasn't been reported yet. Here, we first adopted arabinose- and rhamnose-inducible systems to develop inducible expression of five lysis cassettes (*S<sub>105</sub>*, *A52G*, *C51S S76C*, *LKD*, *LUZ*) in *Escherichia coli* Top10. By measuring *OD*<sub>600</sub>, we characterized the lysis behavior of strains harboring different lysis cassettes. These strains were harvested at different growth stages, induced with different concentrations of chemical inducers, or contained plasmids with different copy numbers. We found that although all five lysis cassettes could induce bacterial lysis in Top10, lysis behaviors differed a lot at various conditions. We further found that due to the difference in background expression levels between strain Top10 and *Pseudomonas aeruginosa* PAO1, it was hard to construct inducible lysis systems in strain PAO1. The lysis cassette controlled by rhamnose-inducible system was finally inserted into the chromosome of strain PAO1 to construct lysis strains after careful screen. The results indicated that *LUZ* and *LKD* were more effective in strain PAO1 than *S<sub>105</sub>*, *A52G* and *C51S S76C*. At last, we constructed an engineered bacteria Q16 using an optogenetic module BphS and the lysis cassette *LUZ*. The engineered strain was capable of adhering to target surface and achieving light-induced lysis by tuning the strength of ribosome binding sites (RBSs), showing great potential in surface modification.

**Keywords:** lysis cassette; inducible systems; synthetic biology; optogenetics; surface modification

作为一门新兴的交叉学科,基于自下而上设计理念的合成生物学(Synthetic Biology)为材料科学<sup>[1]</sup>、化学品生产<sup>[2]</sup>、食品制造<sup>[3]</sup>、临床医学<sup>[4]</sup>等领域的发展带来了全新的机遇。合成生物学的一大特征是通过功能元件的模块化组装进行基因线路的构建。经过表征的标准化元件例如人工合成启动子(promoter)<sup>[5]</sup>、核糖体结合位点(ribosome binding site, RBS)<sup>[6]</sup>、终止子(terminator)<sup>[7]</sup>、绝缘子(insulator)<sup>[8]</sup>,以及具有特殊功能的模块单元例如光遗传学工具<sup>[9]</sup>、基因编辑工具<sup>[10]</sup>、诱导系统<sup>[11]</sup>、蛋白质标签<sup>[12]</sup>等在复

杂基因线路构建中的联合使用,为在真核生物或原核生物中设计并实现特定功能带来极大便利。

功能蛋白的释放是合成生物学中的一个重要研究方向,许多由宿主合成的功能蛋白需要释放至胞外以发挥作用。一种常见的方法即通过与宿主的分泌蛋白进行融合表达,再借助其天然的分泌系统运送至胞外。不过,这类方法不仅受到功能蛋白大小和类型的限制<sup>[13-15]</sup>,且需要研究人员充分熟悉宿主的分泌系统才能够加以利用,使用门槛相对较高。

相比较而言,采用诱导宿主裂解的方式释放

功能蛋白, 不受限于蛋白的体积, 而且几乎不存在宿主依赖性, 具有广泛的应用前景。例如, Hwang 等<sup>[16]</sup>构建了一个可感知铜绿假单胞菌的工程化大肠杆菌菌株, 在环境中存在足够的铜绿假单胞菌时, 群体感应系统开启并表达裂解基因 *E7*, 使大肠杆菌裂解并释放蛋白 DspB 和铜绿假单胞菌毒素 S5, 可有效杀伤生物被膜状态下的铜绿假单胞菌。与分泌释放相比, 裂解不仅能够方便地实现多种功能蛋白的释放, 而且可以限制环境中活细菌的数量, 增强系统的安全性。Din 等<sup>[17]</sup>和 Chowdhury 等<sup>[18]</sup>同样利用细菌的群体感应系统和肿瘤靶向性, 构建了能够在肿瘤组织内持续裂解并释放多种治疗药物的工程菌, 使肿瘤组织中的活菌数量被限制在一定的浓度范围之内, 从而实现高效且安全的肿瘤治疗。此外, 在生物高分子生产<sup>[19]</sup>、减毒活疫苗制造<sup>[20]</sup>、微细胞纯化<sup>[21]</sup>、基因转移<sup>[22]</sup>等相关研究中, 均有裂解模块的运用。

通过诱导表达噬菌体的裂解基因盒子(lysis cassette)可以实现裂解功能在基因回路中的引入。裂解基因盒子通常由穿孔素(holin)、内溶素(endolysin)、跨膜蛋白(Rz-Rz1)组成。因穿孔原理的不同, 可将裂解基因盒子分为 holin-endolysin 和 pinholin-SAR endolysin 两类<sup>[23]</sup>, 分别被称为 I 型穿孔素和 II 型穿孔素。初始状态下, 穿孔素细胞膜上累积, 内溶素则在细胞质内累积, 当穿孔素累积到一定浓度时, 在细胞膜上形成较大孔洞, 将内溶素释放至细胞周质中并破坏肽聚糖层, 引起细菌的裂解。Pinholin 和 SAR-endolysin 在表达后都会在细胞内膜上累积, 且 SAR-endolysin 的一端锚定在内膜中, 另一端活性部分则位于内膜外侧, pinholin 达到一定浓度时在内膜上形成小孔, 随后 SAR-endolysin 从内膜上释放并活化, 进而破坏肽聚糖层, 并引发细菌裂解。

与其他功能模块单元经过系统表征相比,

裂解功能模块虽然在多种基因回路设计中均有涉及, 但是尚未见有工作对其进行较为详细的表征。本研究对两种类型共计 5 个裂解基因盒子引发的细菌裂解行为进行了分析, 探讨了生长状态、诱导系统、诱导剂浓度、表达载体、诱导系统的背景表达水平和诱导表达水平对细菌裂解行为的影响, 为后续利用这些裂解基因盒子构建基因线路提供了研究基础。更进一步地, 我们利用可在近红外光照射下合成第二信使分子 c-di-GMP 的光遗传学工具 BphS<sup>[24]</sup>和裂解基因盒子 *LUZ*, 展示了通过光遗传学技术控制一种可裂解的工程化铜绿假单胞菌进行表面修饰的可能性。本研究通过对若干裂解基因模块的系统表征, 强化了我们对其在不同条件下引发的宿主裂解行为的认识, 对于不同宿主内裂解系统的构建以及拓展和丰富合成生物学工具箱具有重要的意义。

## 1 材料与方 法

### 1.1 材 料

#### 1.1.1 菌株和质粒

本实验中所用菌株和质粒如表 1 所示。

#### 1.1.2 主要试剂及试剂盒

实验所用 LB 培养基配方: 胰蛋白胍(OXOID), 10 g/L; 酵母提取物(OXOID), 氯化钠[生工生物工程(上海)股份有限公司, 以下简称“生工”], 10 g/L。固体培养基中另外含有琼脂 A(生工), 20 g/L。

实验所用限制性培养基 FAB 配方: Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>·12H<sub>2</sub>O(阿拉丁试剂有限公司, 以下简称“阿拉丁”), 12.02 g/L; (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>(阿拉丁), 2 g/L; CaCl<sub>2</sub>·2H<sub>2</sub>O(阿拉丁), 14 mg/L; KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>(阿拉丁), 3 g/L; FeCl<sub>3</sub>(阿拉丁), 1 μmol/L; NaCl(生工), 3 g/L; MgCl<sub>2</sub>(阿拉丁), 93 mg/L; 微量金属元素溶液, 1 mL/L。微量金属溶液含有:

MnSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O (阿拉丁), 200 mg/L; CaSO<sub>4</sub>·2H<sub>2</sub>O (阿拉丁), 200 mg/L; NaMoO<sub>4</sub>·H<sub>2</sub>O (阿拉丁), 10 mg/L; ZnSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O (阿拉丁), 20 mg/L; CoSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O (阿拉丁), 10 mg/L; CuSO<sub>4</sub>·5H<sub>2</sub>O (阿拉丁), 20 mg/L; H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub> (阿拉丁), 5 mg/L。

所用试剂盒包括:质粒提取试剂盒(Omega), 琼脂糖凝胶回收试剂盒(Omega), 聚合酶链式反应(polymerase chain reaction, PCR)试剂盒(南京

诺唯赞生物科技股份有限公司), 无缝克隆连接试剂盒(南京诺唯赞生物科技股份有限公司)。其他试剂还有硫酸庆大霉素(阿拉丁)、氨苄青霉素(阿拉丁), 甘油(阿拉丁), 阿拉伯糖(生工), 鼠李糖(生工), 聚二甲基硅氧烷(polydimethylsiloxane, PDMS)预聚物(美国道康宁公司), agarose (BBI), cy5-甘露糖染料(西安齐岳生物科技有限公司), 蔗糖(阿拉丁), 谷氨酸盐(生工), 琼脂糖(生工)。

表 1 本实验所用菌株和质粒

Table 1 Strains and plasmids used in this study

Strains and plasmids	Characteristics	Sources
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> strains		
<i>P. aeruginosa</i> PAO1	Wild-type strain. None resistance	Lab stock
BphS-PAO1	PAO1, <i>PA1/O4/O3-RBSII-bphS</i> -CTX2. None resistance	Lab stock
BphS-PA2133-PAO1	PAO1-BphS, J23109-B0034- <i>PA2133</i> -Tn7. None resistance	This study
BphS-LUZ-PAO1	PAO1-BphS, pR'-tR'-B0034- <i>LUZ</i> -T0T1-J23109-B0034- <i>PA2133</i> -miniTn7. None resistance	This study
P <sub>rhaBAD</sub> - <i>S105</i> -PAO1	P <sub>rhaBAD</sub> - <i>S105</i> -miniTn7, PAO1. None resistance	This study
P <sub>rhaBAD</sub> - <i>A52G</i> -PAO1	P <sub>rhaBAD</sub> - <i>A52G</i> -miniTn7, PAO1. None resistance	This study
P <sub>rhaBAD</sub> - <i>C51S S76C</i> -PAO1	P <sub>rhaBAD</sub> - <i>C51S S76C</i> -miniTn7, PAO1. None resistance	This study
P <sub>rhaBAD</sub> - <i>LKD</i> -PAO1	P <sub>rhaBAD</sub> - <i>LKD</i> -miniTn7, PAO1. None resistance	This study
P <sub>rhaBAD</sub> - <i>LUZ</i> -PAO1	P <sub>rhaBAD</sub> - <i>LUZ</i> -miniTn7, PAO1. None resistance	This study
P <sub>rhaBAD</sub> - <i>RBSII-S105</i> -PAO1	P <sub>rhaBAD</sub> - <i>RBSII-S105</i> -miniTn7, PAO1. None resistance	This study
P <sub>rhaBAD</sub> - <i>RBSII-A52G</i> -PAO1	P <sub>rhaBAD</sub> - <i>RBSII-A52G</i> -miniTn7, PAO1. None resistance	This study
P <sub>rhaBAD</sub> - <i>RBSII-C51S S76C</i> -PAO1	P <sub>rhaBAD</sub> - <i>RBSII-C51S S76C</i> -miniTn7, PAO1. None resistance	This study
P <sub>rhaBAD</sub> - <i>RBSII-LKD</i> -PAO1	P <sub>rhaBAD</sub> - <i>RBSII-LKD</i> -miniTn7, PAO1. None resistance	This study
P <sub>rhaBAD</sub> - <i>RBSII-LUZ</i> -PAO1	P <sub>rhaBAD</sub> - <i>RBSII-LUZ</i> -miniTn7, PAO1. None resistance	This study
P <sub>rhaBAD</sub> - <i>mScarlet</i> -Tn7-PAO1	P <sub>rhaBAD</sub> - <i>mScarlet</i> -Tn7, PAO1. None resistance	This study
P <sub>rhaBAD</sub> - <i>RBSII-mScarlet</i> -Tn7-PAO1	P <sub>rhaBAD</sub> - <i>RBSII-mScarlet</i> -Tn7, PAO1. None resistance	This study
P <sub>rhaBAD</sub> - <i>RBSII-mScarlet</i> -pJN105-PAO1	P <sub>rhaBAD</sub> - <i>RBSII-mScarlet</i> -pJN105, PAO1. Gm <sup>r</sup>	This study
P <sub>BAD</sub> - <i>RBSII-mScarlet</i> -Tn7-PAO1	P <sub>BAD</sub> - <i>RBSII-mScarlet</i> -Tn7, PAO1. None resistance	This study
P <sub>BAD</sub> - <i>RBSII-mScarlet</i> -pJN105-PAO1	P <sub>BAD</sub> - <i>RBSII-mScarlet</i> -pJN105, PAO1. Gm <sup>r</sup>	Lab stock
Q10	PAO1-BphS-LUZ-PA2133, PcdrA-RBS010- <i>Q</i> (ASV)-pUCP20. Gm <sup>r</sup>	This study
Q16	PAO1-BphS-LUZ-PA2133, PcdrA-RBS016- <i>Q</i> (ASV)-pUCP20. Gm <sup>r</sup>	This study
Q23	PAO1-BphS-LUZ-PA2133, PcdrA-RBS023- <i>Q</i> (ASV)-pUCP20. Gm <sup>r</sup>	This study
Q24	PAO1-BphS-LUZ-PA2133, PcdrA-RBS024- <i>Q</i> (ASV)-pUCP20. Gm <sup>r</sup>	This study
Q25	PAO1-BphS-LUZ-PA2133, PcdrA-RBS025- <i>Q</i> (ASV)-pUCP20. Gm <sup>r</sup>	This study
Q57	PAO1-BphS-LUZ-PA2133, PcdrA-RBS057- <i>Q</i> (ASV)-pUCP20. Gm <sup>r</sup>	This study
Q70	PAO1-BphS-LUZ-PA2133, PcdrA-RBS070- <i>Q</i> (ASV)-pUCP20. Gm <sup>r</sup>	This study
<i>E. coli</i> strains		
Top 10	F <sup>-</sup> , <i>mcrA</i> , ( <i>mrr</i> , <i>hsdRMS-mcrBC</i> ), 80 <i>lacZ</i> M15 <i>lacX74</i> , <i>recA1</i> , <i>araD139</i> , ( <i>ara-leu</i> )7697, <i>galU</i> , <i>galK</i> , <i>rpsL</i> (Str <sup>r</sup> ), <i>endA1</i> , <i>nupG</i> . None resistance	Lab stock

(待续)

(续表 1)

Strains and plasmids	Characteristics	Sources
Plasmids		
pTNS2	A helper plasmid for mini-Tn7 site-specific transposition system. Ap <sup>r</sup>	Lab stock
pFLP2	FRT cassette vector for Flp recombinase. Ap <sup>r</sup>	Lab stock
J23109-B0034-PA2133-miniTn7	PAO1 genome insertion plasmid for constitutive expression of phosphodiesterase PA2133. Gm <sup>r</sup>	This study
pR'-tr'-B0034-LUZ-T0T1-J23109-B0034-PA2133-miniTn7	PAO1 genome insertion plasmid for constitutive expression of phosphodiesterase PA2133 and Q-inducible expression of lysis cassette from <i>P. aeruginosa</i> phage LUZ19. Gm <sup>r</sup>	This study
P <sub>rhaBAD</sub> -S <sub>105</sub> -miniTn7	Rhamnose-inducible expression of S <sub>105</sub> -R-Rz-Rz1 from phage λ. Gm <sup>r</sup>	This study
P <sub>rhaBAD</sub> -A52G-miniTn7	Rhamnose-inducible expression of A52G-R-Rz-Rz1. Gm <sup>r</sup>	This study
P <sub>rhaBAD</sub> -C51S S76C-miniTn7	Rhamnose-inducible expression of C51S S76C-R-Rz-Rz1. Gm <sup>r</sup>	This study
P <sub>rhaBAD</sub> -LKD-miniTn7	Rhamnose-inducible expression of lysis cassette <i>P. aeruginosa</i> phage LKD16. Gm <sup>r</sup>	This study
P <sub>rhaBAD</sub> -LUZ-miniTn7	Rhamnose-inducible expression of LUZ lysis cassette. Gm <sup>r</sup>	This study
P <sub>rhaBAD</sub> -RBSII-S <sub>105</sub> -miniTn7	Rhamnose-inducible expression of S <sub>105</sub> -R-Rz-Rz1 and the ribosome binding site was RBSII. Gm <sup>r</sup>	This study
P <sub>rhaBAD</sub> -RBSII-A52G-miniTn7	Rhamnose-inducible expression of A52G-R-Rz-Rz1 and the ribosome binding site was RBSII. Gm <sup>r</sup>	This study
P <sub>rhaBAD</sub> -RBSII-C51S S76C-miniTn7	Rhamnose-inducible expression of C51S S76C-R-Rz-Rz1 and the ribosome binding site was RBSII. Gm <sup>r</sup>	This study
P <sub>rhaBAD</sub> -RBSII-LKD-miniTn7	Rhamnose-inducible expression of LKD lysis cassette and the ribosome binding site was RBSII. Gm <sup>r</sup>	This study
P <sub>rhaBAD</sub> -RBSII-LUZ-miniTn7	Rhamnose-inducible expression of LUZ lysis cassette and the ribosome binding site was RBSII. Gm <sup>r</sup>	This study
P <sub>BAD</sub> -RBSII-S <sub>105</sub> -pJN105	Arabinose-inducible expression of S <sub>105</sub> -R-Rz-Rz1 with RBSII. Gm <sup>r</sup>	Lab stock
P <sub>BAD</sub> -RBSII-A52G-pJN105	Arabinose-inducible expression of A52G-R-Rz-Rz1 with RBSII. Gm <sup>r</sup>	Lab stock
P <sub>BAD</sub> -RBSII-C51S S76C-pJN105	Arabinose-inducible expression of C51S S76C-R-Rz-Rz1 with RBSII. Gm <sup>r</sup>	Lab stock
P <sub>BAD</sub> -RBSII-LKD-pJN105	Arabinose-inducible expression of LKD lysis cassette with RBSII. Gm <sup>r</sup>	Lab stock
P <sub>BAD</sub> -RBSII-LUZ-pJN105	Arabinose-inducible expression of LUZ lysis cassette with RBSII. Gm <sup>r</sup>	Lab stock
P <sub>rhaBAD</sub> -mScarlet-Tn7	PAO1 genome insertion plasmid for rhamnose-inducible expression of mScarlet. Gm <sup>r</sup>	This study
P <sub>rhaBAD</sub> -RBSII-mScarlet-Tn7	PAO1 genome insertion plasmid for rhamnose-inducible expression of mScarlet and the ribosome binding site was RBSII. Gm <sup>r</sup>	This study
P <sub>rhaBAD</sub> -RBSII-mScarlet-pJN105	Rhamnose-inducible expression of mScarlet in low-copy plasmid. Gm <sup>r</sup>	This study
P <sub>BAD</sub> -RBSII-mScarlet-Tn7	PAO1 genome insertion plasmid for arabinose-inducible expression of mScarlet and the ribosome binding site was RBSII. Gm <sup>r</sup>	This study
P <sub>BAD</sub> -RBSII-mScarlet-pJN105	Arabinose-inducible expression of mScarlet with RBSII in low-copy plasmid. Gm <sup>r</sup>	Lab stock
PcdrA-RBS10-Q(ASV)-pUCP20	C-di-GMP-responsive expression of antiterminator protein Q with RBS10. Gm <sup>r</sup>	This study
PcdrA-RBS16-Q(ASV)-pUCP20	C-di-GMP-responsive expression of antiterminator protein Q with RBS16. Gm <sup>r</sup>	Lab stock
PcdrA-RBS23-Q(ASV)-pUCP20	C-di-GMP-responsive expression of antiterminator protein Q with RBS23. Gm <sup>r</sup>	This study
PcdrA-RBS24-Q(ASV)-pUCP20	C-di-GMP-responsive expression of antiterminator protein Q with RBS24. Gm <sup>r</sup>	This study
PcdrA-RBS57-Q(ASV)-pUCP20	C-di-GMP-responsive expression of antiterminator protein Q with RBS57. Gm <sup>r</sup>	This study
PcdrA-RBS70-Q(ASV)-pUCP20	C-di-GMP-responsive expression of antiterminator protein Q with RBS70. Gm <sup>r</sup>	This study

Gm<sup>r</sup>: Gentamicin resistance, 15 μg/mL in *E. coli*, 30 μg/mL in *P. aeruginosa*; Ap<sup>r</sup>: Ampicillin resistance, 100 μg/mL in *E. coli*, 300 μg/mL in *P. aeruginosa*.

### 1.1.3 主要仪器

激光共聚焦显微镜(Olympus, 型号IX-71), 注射器泵(Harvard, 型号 Mask aligner), 功率计(Newport, 型号为 818-ST2), 去离子水机(Merck Millipore, 型号 Advantage A10), 摇床(SUSS MicroTec, 型号 MJB4), 酶标仪(Biotech, 型号 SYNERGY H1), Nanodrop 2000 (Thermo Fisher), 微量离心机(Thermo Scientific, 型号 Pico21), 电穿孔仪(Bio-Rad, 型号 617BR109469), 生化培养箱(上海丙林电子科技有限公司, SPX 系列), 高温高压灭菌锅(SANYO, 型号 MDF-U538), 多功能成像仪(耶拿)。

## 1.2 方法

### 1.2.1 大肠杆菌菌株及铜绿假单胞菌菌株构建

质粒构建过程中的各基因片段或载体通过 PCR 反应扩增得到, 所涉及的引物及其序列如表 2 所示, 引物均由生工合成。裂解基因盒子相关基因的 NCBI 序列号如下, *S<sub>105</sub>*: holin, 5740919; endolysin, 2703480; Rz, 2703481; Rz1, 5739319. *LKD*: holin, 5687451; endolysin, 5687445; Rz, 5687434; Rz1, 5687423. *LUZ*: holin, 5896758; endolysin, 5896761; Rz, 5896767; Rz1, 5896763。通过无缝克隆连接试剂盒进行质粒构建, 加入各 PCR 片段的量均为 100 ng 左右, 于 37 °C 反应 30 min。连接完成后, 使用化学转化法将连接产物转化到大肠杆菌 Top10 感受态细胞中, 冰上孵育 30 min 后, 于 42 °C 水浴中热激 90 s, 再次置于冰上 3–5 min, 加入 800 μL LB 培养基, 随后置于温度为 37 °C、转速为 250 r/min 的摇床中孵育 1 h。将菌液离心后涂布至含有相应抗生素的 LB 琼脂板上, 于 37 °C 培养箱中培养 12 h。次日, 挑取单克隆点进行 PCR 鉴定, 选取鉴定正确的单克隆点进行扩大培养并送至生工进行测序。本研究中所用的质粒均由测序确认其正确性, 使用终浓度为 35% 的甘油溶液将测序正确的菌株保存至 -80 °C 冰箱, 以便后续使用。所有 PCR 反

应以及无缝克隆连接的组分配置及反应条件均参照试剂盒说明书。

将测序正确的菌株扩大培养并提取质粒, 随后用电化学转化法(电转)将质粒转化至对应铜绿假单胞菌中, 即获得相应的铜绿假单胞菌菌株, 所有的铜绿假单胞菌菌株均在终浓度为 35% 的甘油溶液中 -80 °C 保存, 以便后续使用。电转的方法参照标准流程<sup>[25]</sup>进行: 将待电转的铜绿假单胞菌菌株离心收集后, 用 1 mL 浓度为 300 mmol/L 的蔗糖重悬, 随后用 1 000 r/min 离心 1 min 收集菌体, 弃去上清液后再次用 1 mL 浓度为 300 mmol/L 蔗糖重悬并离心收集菌体, 再次弃去上清液。使用 100 μL 浓度为 300 mmol/L 的蔗糖重悬菌体, 加入待电转质粒后静置 3–5 min。电转 miniTn7 质粒时, 除加入 500 ng 对应的 miniTn7 质粒外, 还需加入 200 ng pTNS2 辅助质粒; 其余质粒加 100 ng 即可, 无需额外加入 pTNS2 质粒。电转时使用的电压为 2.5 kV, 电转后在电转杯中加入 1 mL LB 液体培养基并转移至 15 mL 摇菌管中, 于温度为 37 °C、转速为 250 r/min 的摇床中孵育。电转 miniTn7 质粒后孵育时间为 3 h, 其余质粒孵育时间为 1 h。将菌液离心后涂布至含有相应抗生素的 LB 琼脂板上, 于 37 °C 培养箱中培养 12 h。Tn7 质粒可将目的基因片段整合至铜绿假单胞菌基因组中, 在 Tn7 质粒电转入铜绿假单胞菌菌株后, 需要对琼脂板上的单克隆点进行 PCR 鉴定, 随后, 再次电转 pFPL2 质粒到鉴定正确的菌株中以通过 FRT 位点去除庆大抗性基因片段。将生长出的单克隆点划线于 LB+15% 蔗糖的琼脂板上, 以迫使细菌丢弃 pFLP2 质粒, 挑选生长出的单克隆点并分别划线于 LB、LB+Gen30 和 LB+Carb300 琼脂板上, 选择仅能够在 LB 上生长的单克隆点并测序, 确保目的基因通过 Tn7 载体准确插入基因组中。

表 2 文中所用引物序列

Table 2 Primer sequences used in this study

Primer name	Sequence (5'→3')
B0034-F	GAAAAGCTTAAAGAGGAGAAAATTAAGCGTGAACGGTTCCCC
B0034-R	TTTCTCCTCTTTAAGCTTTTCCACAGCTAGCA
PcdrA-RBS-R	AAGCTTTTCCACACCCGGTCGTATTAACCGGAA
RBS010-Q-F	GACCGGGTGTGGAAAAGCTTAAATTTGGGAAATTAAGCATGAGACTCGAAAGCG
RBS016-Q-F	GACCGGGTGTGGAAAAGCTTAAAGGAGGGGAATTAAGCATGAGACTCGAAAGCG
RBS023-Q-F	GACCGGGTGTGGAAAAGCTTAAAGCTGGCTGAATTAAGCATGAGACTCGAAAGCG
RBS024-Q-F	GACCGGGTGTGGAAAAGCTTAAATGAGGCCGAATTAAGCATGAGACTCGAAAGCG
RBS025-Q-F	GACCGGGTGTGGAAAAGCTTAAATGGGCTAATTAAGCATGAGACTCGAAAGCG
RBS057-Q-F	GACCGGGTGTGGAAAAGCTTATTGGCTTTGGGTTAAGCATGAGACTCGAAAGCG
RBS070-Q-F	GACCGGGTGTGGAAAAGCTTCGCAATCTATCGTTAAGCATGAGACTCGAAAGCG
mScarlet-pJN-F	GCTGTGAAAAGAAGGAGATTAAGCATGGTGAGCAAGGGCGAGGC
pJN-RBSII-R	GCTTAATCTCCTTCTTTTCCACAGCGAATTCGCTAGCCCAAAAAAACGG
Tn7-ass-F	AAGCTTCTCGAGGAATTCCTGCAG
Tn7-ass-R	GGTACCTCGCAAGGCCTTG
mScarlet-Tn7-R	CTGCAGGAATTCCTCGAGAAGCTTTCACCTGTACAGCTCGTCCATG
rhaR-F	CAAGGCCTTCGCGAGGTACCTTAATCTTTCTGCGAATTGAGATGACGCCA
rhaB-R	TGAATTTCAATTACGACCAGTCTAAAAAGCG
rhaB-RBSII-F	GACTGGTCGTAATGAAATTCACCCGTTTTTTTGGGCTAGCGA
mScarlet-pJN-R	ACTATAGGGCGAATTGGAGCTCTCAGTGTACAGCTCGTCCATGC
λ-R	CTGCAGGAATTCCTCGAGAAGCTTCTATCTGCACTGCTCATTAATATACT
RBSII-λ-F	GCTGTGAAAAGAAGGAGATTAAGCATGCCAGAAAAACATGACCTGT
Tn7-RBSII-R	GCTTAATCTCCTTCTTTTCCACAGCG
RBSII-LKD-F	GCTGTGAAAAGAAGGAGATTAAGCATGATGCTCGATAACCGCCAC
LKD-R	CTGCAGGAATTCCTCGAGAAGCTTTCAGTCTCCTTGATTCAAGGCGC
RBSII-LUZ-F	GCTGTGAAAAGAAGGAGATTAAGCATGATGCTCGATAACCGCCAC
LUZ-R	CTGCAGGAATTCCTCGAGAAGCTTTCAGTCTCCTTGATTCAAGGCGT

在光控裂解基因线路的构建部分,使用实验室已有的 BphS-PAO1 菌株作为初始底盘菌株,随后将 pR'-tR'-B0034-LUZ-T0T1-J23109-B0034-PA2133-miniTn7 基因按照上述方法插入 BphS-PAO1 菌株中并去除庆大抗性基因片段,得到 BphS-LUZ-PAO1 菌株,随后将 PcdrA-RBS(N)-Q(ASV)-PUCP20 质粒电转入 BphS-LUZ-PAO1 中,即得到菌株 Q(N),其中 N=10, 16, 23, 24, 25, 57, 70。

### 1.2.2 细菌裂解曲线的测量

本研究使用酶标仪测量细菌的裂解曲线。实

验前一天,将保种于-80 °C冰箱中的甘油菌划线于对应抗性的琼脂板上,挑选单克隆点于 2 mL LB 液体培养基中扩大培养至目标  $OD_{600}$  值附近。对于需要重新扩大培养的菌液,吸取 10 μL 过夜培养(约 12 h)的菌液于 1 mL LB 液体培养基中培养至目标  $OD_{600}$  值附近。对于需要稀释的菌液,吸取 500 μL 原菌液后加入 500 μL 新鲜培养基,轻轻吹打均匀后备用,注意避免产生气泡。随后,吸取菌液加入 96 孔板中,每孔加入菌液体积为 100 μL,每个样品设置 3-4 个重复组。加完样品后,用排枪快速加入相应的诱导剂,放入酶标仪

中进行生长曲线测量。所有  $OD_{600}$  曲线中的 0 时刻即为加入诱导剂的时间点。如无特殊说明, 本研究中使用的诱导剂为 0.2% 阿拉伯糖 (L-arabinose, 母液浓度为 20%), 0.1% 的鼠李糖 (L-rhamnose, 母液浓度为 10%)。酶标仪温度设置为 30 °C, 双轨道快速振荡模式, 每隔 3 min 读取一次 600 nm 处的吸收值。

### 1.2.3 不同诱导系统的背景表达量和诱导表达量的测量

本研究使用酶标仪测量不同诱导系统在大肠杆菌和铜绿假单胞菌中的背景表达量和诱导表达量。实验前一天, 将保存于-80 °C 冰箱中的甘油菌划线于对应抗性的琼脂板上, 挑选单克隆点于 2 mL LB 液体培养基中扩大培养至  $OD_{600}$  值约为 0.2, 随后以 1:100 的比例稀释于新鲜 LB 培养基中(含有对应浓度的抗生素)。按照每孔 100  $\mu$ L 的体积加入 96 孔板中, 对照组中不加诱导剂, 实验组中加入终浓度为 0.2% 的阿拉伯糖或者 0.1% 的鼠李糖。每个样品设置 4 个对照组。酶标仪温度设置为 30 °C, 双轨道快速振荡模式, 每隔 30 min 读取一次激发波长为 561 nm、发射波长为 605 nm 的荧光强度值和 600 nm 处的吸收值。

### 1.2.4 光控可裂解菌斑的筛选

实验前一天, 将保存于-80 °C 冰箱中的甘油菌划线于含有终浓度为 30  $\mu$ g/mL 的庆大霉素 (Gen 30) 的琼脂板上, 挑选单克隆点于 1 mL LB+Gen 30 液体培养基中扩大培养至  $OD_{600}$  值约为 1.0。随后分别滴加 5  $\mu$ L 或 10  $\mu$ L 体积的菌液于 4 块 Gen 30 琼脂板上, 其中 2 块避光培养, 另 2 块放置于红光下进行光照培养, 光强约为 2 mW/cm<sup>2</sup>。培养温度约为 26 °C, 培养时间为 48 h, 菌斑的黑白图片由多功能成像仪获取。

### 1.2.5 显微镜图片的采集

本研究使用 Olympus 公司的 IX-71 倒置显微

镜采集细菌的明场及荧光图片。显微镜配备有 60 $\times$  和 100 $\times$  的浸油物镜 (Olympus), 显微镜 xy 移物台 (Ludl), Zyla 4.2 sCMOS 相机 (Andor), Spectra X 固体光源 (Lumencor) 和一批定制的滤光片。

图 2C 的图片采集方式如下: 实验前一天, 将保种于-80 °C 冰箱中的甘油菌划线于对应抗性的琼脂板上, 挑选单克隆点于 1 mL LB 液体培养基中扩大培养至  $OD_{600}$  约 2.0。随后, 用新鲜培养基将菌液稀释至  $OD_{600}$  值约为 0.05, 用旋涡混匀仪混匀, 使细菌充分分散。吸取 3-5  $\mu$ L 菌液滴加至约 2 mm 厚的 1% (质量体积分数) 琼脂糖薄片 (FAB 培养基含有 1  $\mu$ mol/L 氯化铁+30 mmol/L 谷氨酸盐+1% 琼脂糖) 上, 待液体风干后, 倒扣在盖玻片上, 即可进行显微镜图片采集。拍摄 mScarlet 所用的激发波长为 (561 $\pm$ 25) nm, 发射波长为 (598 $\pm$ 25) nm。为了保证荧光数据的可靠性, 每个菌种采取 4 $\times$ 4 视野的蒙太奇拍摄方式以拍摄尽可能多的细菌。

### 1.2.6 微流实验

实验前一天, 将保种于-80 °C 冰箱中的甘油菌划线于含有终浓度为 30  $\mu$ g/mL 的庆大霉素 (Gen 30) 的琼脂板上, 挑选单克隆点于 1 mL LB+Gen 30 液体培养基中扩大培养至  $OD_{600}$  约为 0.5。进行微流实验时, 首先利用 1 mL 注射器将细菌由进液口注入微流装置<sup>[26]</sup>中, 随后更换为 20 mL 含有新鲜 LB 培养基的注射器, 推流速度设置为 2 mL/h, 废液由废液口流出。微流装置的通道长度为 15 mm, 宽度为 1.2 mm, 高度为 0.2 mm, 进液口与废液口的直径均为 0.8 mm。显微镜光控实验按照本课题组已建立的方法进行<sup>[27]</sup>, 通过设置控制程序, 对每个视野施加独立的光照强度和光照时间, 即可获得不同的光诱导效果。微流实验过程中, 每隔 20 min 获取一组明场图片。实验结束后, 在微流装置通道中注入 100  $\mu$ L cy5-甘露糖染料 (10  $\mu$ g/mL), 静置 10 min。随后, 使

用 PBS 冲洗 5–10 min, 拍摄各视野的荧光图片。荧光拍摄条件为: 激发波长(561±25) nm, 发射波长(598±25) nm。

## 2 结果与分析

### 2.1 在大肠杆菌中诱导表达裂解基因盒子及引发的裂解行为

在 pJN105 质粒中的阿拉伯糖启动子(P<sub>BAD</sub>)下游接入 5 种裂解基因盒子, 以探究其在大肠杆菌中引发的裂解行为差异。这些裂解基因盒子包括: 来自 λ 噬菌体(NC\_001416.1)的原始裂解基因盒子 *S<sub>105</sub>-R-Rz-RzI* 及 *S<sub>105</sub>* 突变体 *S<sub>105</sub>(A52G)-R-Rz-RzI*、*S<sub>105</sub>(C51S S76C)-R-Rz-RzI*<sup>[28-29]</sup>, 来自铜绿假单胞菌噬菌体 LKD16 (GenBank 登录号: NC\_009935.1)的裂解基因盒子 *LKD*<sup>[30]</sup>, 以及来自铜绿假单胞菌噬菌体 LUZ19 (GenBank 登录号: NC\_010326.1)的裂解基因盒子 *LUZ*<sup>[31]</sup>。其中, *S<sub>105</sub>*、*S<sub>105</sub>(A52G)*和 *S<sub>105</sub>(C51S S76C)*基因编码 I 型 holin 蛋白, R 基因编码 endolysin 蛋白; 而 *LKD* 和 *LUZ* 所编码 holin 属于 II 型 holin, 其裂解基因盒子组成序列类似(图 1)。

在不同生长状态的大肠杆菌菌株 Top10 中, 分别加入终浓度为 0.2% 的阿拉伯糖诱导裂解基因盒子表达, 随后通过 *OD*<sub>600</sub> 值的检测来观察细菌的裂解过程, 结果如图所示。在 *OD*<sub>600</sub> 值为 0.5 的细菌中(图 2A), *C51S S76C* 和 *A52G* 均可以快速地诱导裂解, 裂解行为在加入诱导剂后数分钟

内便发生。其中 *A52G* 的诱导表达可以引起细菌缓慢且持续地裂解, 而 *C51S S76C* 的诱导表达在前 12 min 内即可以引起细菌的快速裂解, 随后细菌的裂解逐渐趋于平缓。含有 *S<sub>105</sub>* 的菌株在加入诱导剂大约 18 min 后才开始大量裂解, 其裂解起始时间显著明显偏晚。以上结果与前人的结论相吻合, 即 *A52G* 与 *C51S S76C* 是两个快速裂解突变体<sup>[29]</sup>。但是我们也发现, 在这种生长状态下, *S<sub>105</sub>* 的裂解效率(达到裂解稳态时的 *OD*<sub>600</sub> 值越低则裂解效率越高)始终高于 *A52G* 与 *C51S S76C* 这两个突变体。我们同时观察到, 与 I 型 holin 无法兼顾裂解起始时间和裂解效率不同, 诱导表达含有 II 型 holin 的 *LKD* 和 *LUZ* 裂解基因盒子能够引起大肠杆菌快速且高效地裂解。*LKD* 和 *LUZ* 在加入诱导剂 5 min 左右后, 细菌即开始裂解, 并在随后的 6 min 时间内达到裂解稳态, 根据菌落形成单位(colony forming unit, CFU)计数统计, 裂解的细菌比例到达 99.99% 以上(数据未展示), 裂解效率极高。此外, 含有不同裂解基因盒子的菌株, 在 *OD*<sub>600</sub> 值为 1.0 的细菌中与 *OD*<sub>600</sub> 值为 0.5 时相比, 加入诱导剂后的裂解行为相差不大(图 2B)。

继续观察过夜(约 12 h)培养后不同菌株的裂解行为。结果显示, 在加入诱导物后, 所有菌株的裂解行为均趋向平缓, 裂解起始时间增加且裂解效率显著下降(图 2C), 而 *A52G* 仍然是裂解起始时间最早的裂解基因盒子。为了让细菌的

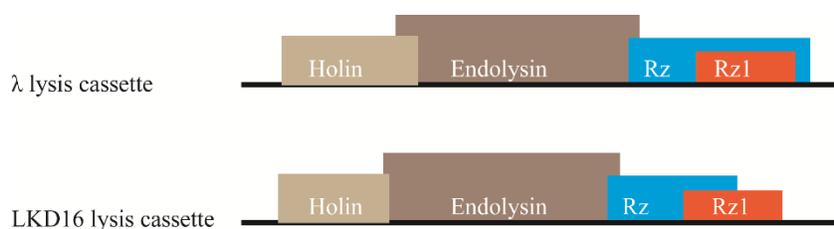


图 1 λ 噬菌体和 LKD16 噬菌体裂解基因盒子示意图

Figure 1 Schematic diagram of λ lysis cassette and LKD16 lysis cassette.

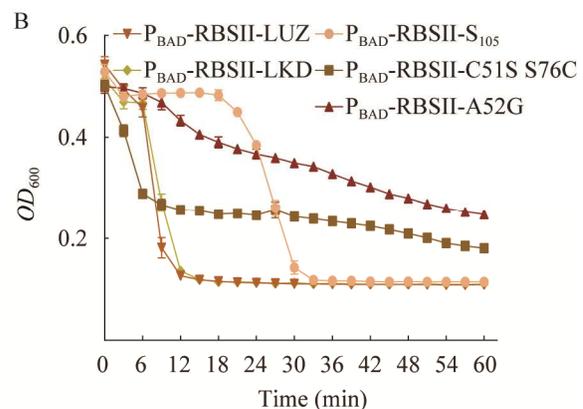
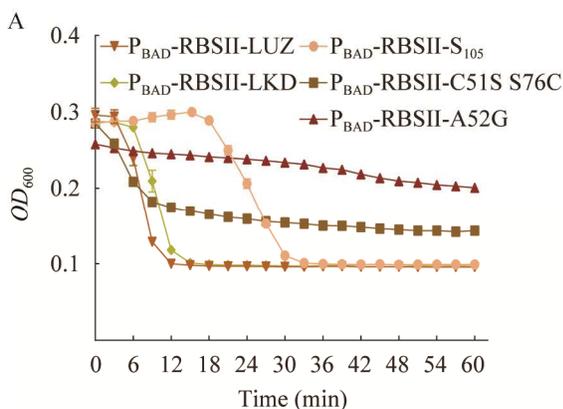
裂解起始时间提前且更快地进入裂解稳态, 我们首先将过夜培养的菌液以 1:100 稀释, 再重新扩大培养至  $OD_{600}$  值约为 1.0, 再次加入诱导剂诱导裂解, 由此引发的各菌株的裂解行为与图 2B 中几乎相当。我们也意外地发现, 通过稀释的方法使细菌的  $OD_{600}$  值降低至 1.0 附近, 也能够使含有 *LKD* 和 *LUZ* 的菌株的裂解起始时间明显提前且能够迅速进入裂解稳态, 而含有 *A52G* 和 *S<sub>105</sub>* 的菌株的裂解起始时间则稍有推迟, 这种现象有可能与细菌密度或者生长状态同时有关。

我们探究了不同诱导系统对细菌裂解行为的影响(图 2E、2F)。结果表明, 通过鼠李糖诱导系统<sup>[32]</sup>表达 *C51S S76C* 难以使大肠杆菌发生有效地裂解, 诱导表达 *A52G* 的菌株可以引起缓慢地裂解, 而诱导表达 *S<sub>105</sub>* 的菌株在大约 120 min 开始发生明显的裂解行为, 其裂解速度也显著慢于阿拉伯糖诱导系统。此外, 在阿拉伯糖诱导系统中裂解起始时间相当的 *LUZ* 与 *LKD* 裂解基因盒子, 在鼠李糖诱导系统中却产生了显著的差异。其中 *LKD* 的裂解起始时间在 120 min 左右, 而 *LUZ* 的裂解起始时间在 18 min 左右, 显著早于其他 4 种裂解基因盒子。综合以上结果, 我们认为含有 II 型 holin 的裂解基因盒子与 I 型 holin 相比能够更有效地引起大肠杆菌菌株裂解。此外, 在对数

生长期的细菌中, *LUZ* 的裂解能力强于其他 4 个裂解基因盒子, 在相同的载体中能够引起更快速且高效的细菌裂解。

随后, 我们研究了诱导剂浓度对细菌裂解行为的影响(图 2G)。结果显示, 在诱导剂浓度能够引发充分的基因表达的情况下<sup>[11,32]</sup>, 在阿拉伯糖诱导系统中, 不同浓度的诱导剂对裂解行为的影响程度较低; 在鼠李糖诱导系统中, 不同浓度的诱导剂对裂解起始时间几乎没有影响, 而高浓度的诱导剂会引起更剧烈的裂解行为。我们也曾对图 2C 中高  $OD$  的菌株中进行过高浓度的诱导剂(0.3% L-rhamnose)处理, 结果发现其裂解曲线与 0.1% L-rhamnose 处理时没有显著区别。

我们又继续观察利用不同拷贝数的载体表达裂解基因盒子对细菌裂解行为的影响(图 2H)。结果显示, 在观察的两个生长状态下, 含有高拷贝载体(Tn7)的细菌裂解起始时间均早于含有低拷贝载体(pJN105)的细菌。我们还发现, 含有高拷贝载体的细菌, 其在  $OD_{600}$  约为 1.0 时的裂解起始时间与  $OD_{600}$  约为 0.5 时相比显著提前, 这一现象在低拷贝载体中并没有出现。对于含有 I 型 holin 的 *S<sub>105</sub>* 裂解基因盒子, 我们也得到了与图 2F-G 类似的结果(数据未展示)。这表明, 不仅 I 型 holin 的裂解行为是浓度依赖型的<sup>[33]</sup>, II 型 holin 也是如此。



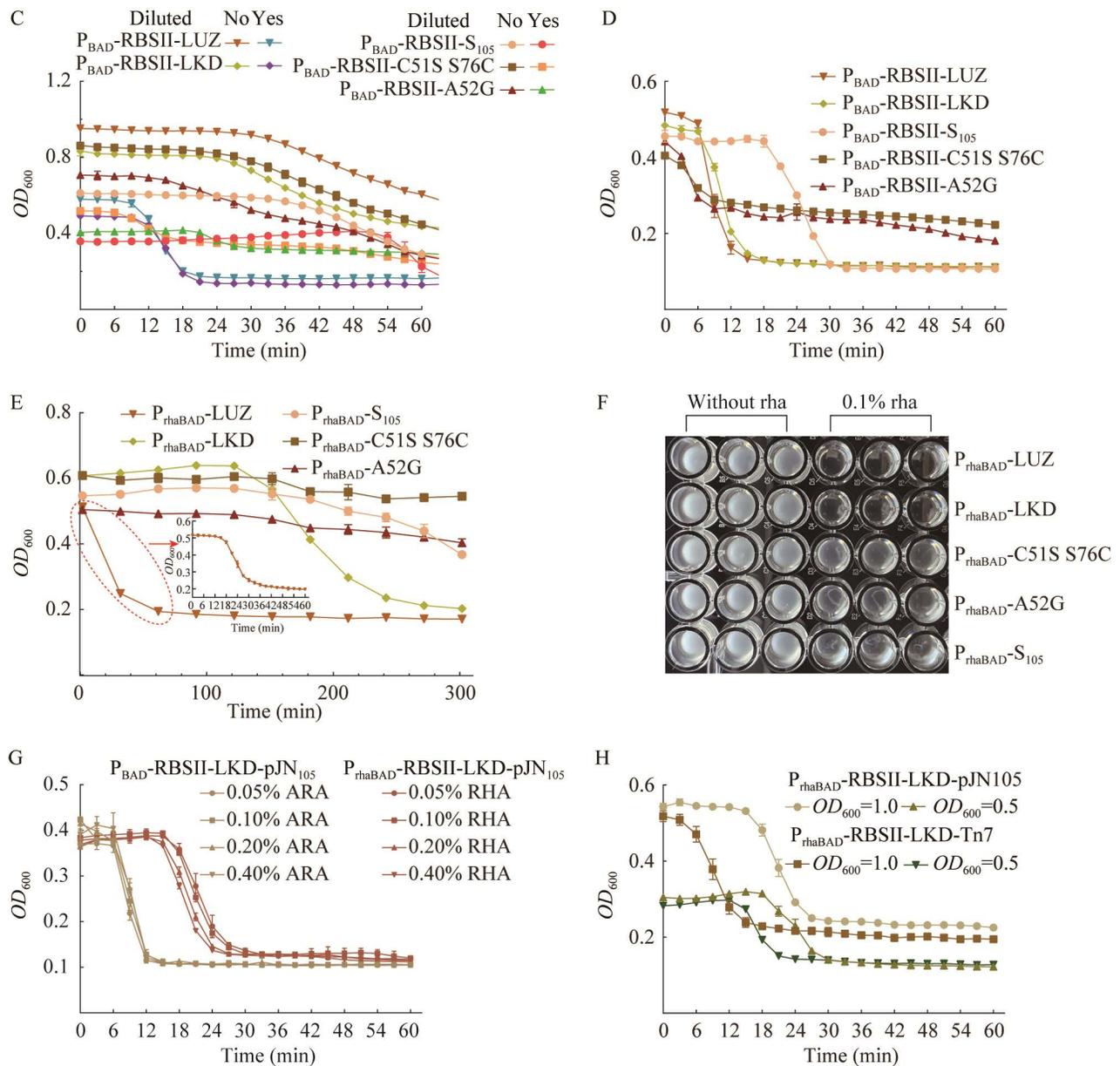


图2 不同条件下裂解基因盒子在大肠杆菌中的裂解行为表征

Figure 2 Characterization of lysis behaviors of *Escherichia coli* strains harboring different lysis cassettes in different conditions. Lysis curves of *E. coli* strains harboring plasmids ( $P_{BAD}$ -RBSII-lysis cassettes-pJN105) in different growth stages after induction with 0.2% arabinose. A:  $OD_{600} \approx 0.5$ . B:  $OD_{600} \approx 1.0$ . C: Stationary phase and 1:1 dilution of original bacterial suspensions. D: Dilution of strains in stationary phase and re-cultured to  $OD_{600} \approx 1.0$ . E: Lysis curves of *E. coli* strains harboring plasmids ( $P_{rhaBAD}$ -lysis cassettes-miniTn7) at  $OD_{600} \approx 1.0$  after induction with 0.1% rhamnose. F: Digital images of bacterial suspensions in 96-well plate after treatment in (E) and the control groups (without induction) were also demonstrated. G: Lysis curves of *E. coli* strains harboring plasmids  $P_{BAD}$ -RBSII-LKD-pJN105 or  $P_{rhaBAD}$ -RBSII-LKD-pJN105 after induction with different concentrations of arabinose of rhamnose. H: Lysis curves of *E. coli* strains harboring plasmids  $P_{rhaAD}$ -RBSII-LKD-pJN105 or  $P_{rhaBAD}$ -RBSII-LKD-miniTn7 in different growth stages after induction with 0.1% rhamnose. All data are mean with SD (standard deviation) arising from  $\geq 3$  replicates.

## 2.2 裂解行为与诱导系统背景表达量与诱导表达量的关系

我们需要在铜绿假单胞菌 PAO1 内构建含有裂解基因盒子的诱导表达系统,以表征其在 PAO1 中引起的裂解行为差异。将含有裂解基因盒子的 pJN105 质粒电转入 PAO1 后,琼脂板上没有克隆点形成。此外,过夜培养含有  $P_{BAD}$ -RBSII- $S_{105}$ -pJN105 与  $P_{BAD}$ -RBSII- $A52G$ -pJN105 质粒的大肠杆菌菌株难以达到很高的  $OD_{600}$  值,并有聚

集物残渣产生(图 3A 左)。同时,虽然含有高拷贝载体的大肠杆菌的裂解起始时间较早,不过其自身在未加诱导剂时即会产生明显的自溶现象(图 3A 右),而在含有低拷贝载体的细菌中则未观察到类似现象产生。以上实验结果表明,相同的诱导系统中裂解基因本身裂解能力的不同,以及不同诱导系统在不同宿主之间的背景表达水平和诱导表达水平的不同都有可能造成裂解行为的差异。

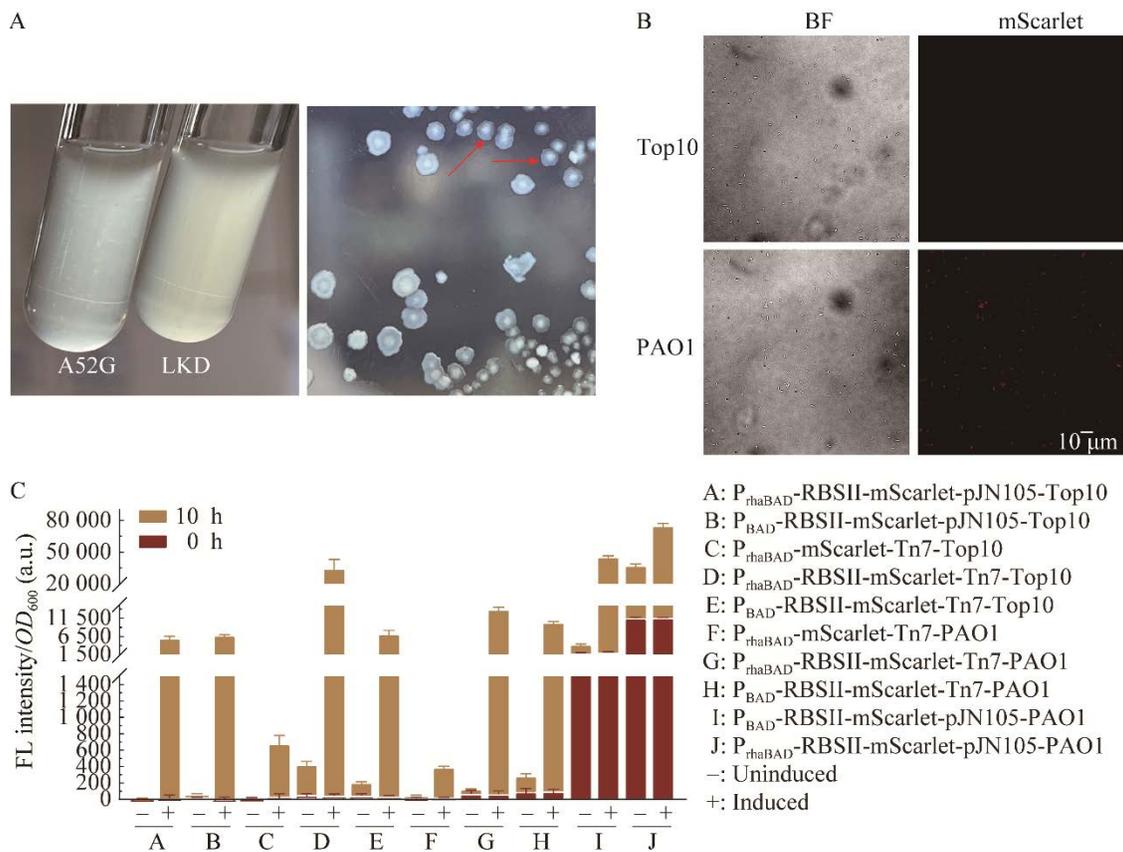


图 3 诱导系统的背景表达量与诱导表达量对细菌裂解行为的影响

Figure 3 The influence of basal expression and induced expression level of inducible systems on bacterial lysis behavior. A: Digital images of bacterial suspensions of *Escherichia coli* strains harboring plasmids  $P_{BAD}$ -RBSII- $A52G$ -pJN105 or  $P_{BAD}$ -RBSII- $LKD$ -pJN105 after overnight culture (left) and self-lysed  $P_{rhaBAD}$ -RBSII- $LKD$ -Tn7-Top10 colonies on agar plates (right). B: Representative BF and fluorescence images of Top10 or PAO1 harboring plasmid  $P_{BAD}$ -RBSII-mScarlet-pJN105 without induction. Scale bar=10  $\mu$ m. C: Fluorescence intensities of uninduced or induced Top10 or PAO1 strains as listed right of the picture at 0 h and 10 h. All data are mean with SD arising from  $\geq 3$  replicates.

通过荧光报告系统可以分析不同诱导系统在不同菌株中的背景表达水平和诱导表达水平。首先,我们在荧光显微镜下分别观察了携带  $P_{BAD}$ -RBSII-*mScarlet*-pJN105 质粒的大肠杆菌菌株 Top10 和铜绿假单胞菌菌株 PAO1(图 3B)。结果表明,在未添加诱导剂的情况下,阿拉伯糖诱导系统在大肠杆菌中的背景表达水平较低,而在铜绿假单胞菌中背景表达水平较高。前人也报道了阿拉伯糖诱导系统在铜绿假单胞菌中的高背景表达问题,并声称鼠李糖诱导系统在铜绿假单胞菌内有显著降低的背景表达水平及较高的诱导倍数<sup>[32]</sup>。我们在 pJN105 和 Tn7 两种质粒载体中分别构建了这两套诱导系统,利用荧光强度的变化来观察它们在大肠杆菌和铜绿假单胞菌内的表达差异(图 3C)。我们发现通过低拷贝载体 pJN105 表达阿拉伯糖诱导系统或鼠李糖诱导系统时,其在铜绿假单胞菌内的背景表达量显著增加:鼠李糖诱导系统在 PAO1 中几乎完全失去背景抑制能力,在未加诱导物的情况下,该诱导系统在铜绿假单胞菌中的背景表达量是大肠杆菌中的 1 700 倍之多,而诱导表达量仅有 10 倍;阿拉伯糖的背景表达量也增加 66 倍,诱导表达量则仅有 6 倍。我们也发现,当保留鼠李糖诱导系统的原始核糖体结合位点时,虽然背景表达降至极低水平,但是在大肠杆菌和铜绿假单胞菌内几乎都丧失了诱导表达能力(数据未展示)。在大肠杆菌内,阿拉伯糖和鼠李糖诱导系统在高拷贝载体(Tn7)中的背景表达量分别是低拷贝载体中的 4 倍和 23 倍,诱导表达量则分别为 2.8 倍和 1.0 倍。通过 Tn7 质粒可将目的基因插入铜绿假单胞菌的基因组中<sup>[34]</sup>,基因组表达的阿拉伯糖和鼠李糖诱导系统分别是低拷贝载体表达的背景表达量分别为 1/12 和 1/450,而诱导表达量分别为 1/4.0 和 1/4.5。我们意外地发现通过基因组表达鼠李糖诱导系统,可以显著降低背景表达水平,同时对诱导表达水平影响较小,这

样就极大地增加了诱导倍数。我们还注意到,在基因组表达鼠李糖诱导系统中,是否含有 RBSII 对背景表达量影响不大(2 倍),不过诱导倍数却会产生 38 倍的差异,这提示我们或许可以通过调整 RBS 的强度来调整某些诱导系统的诱导倍数。

综合以上结果,我们认为,质粒表达的阿拉伯糖和鼠李糖诱导系统在大肠杆菌内背景表达低且诱导倍数高,因此能够引起快速高效地裂解;而在铜绿假单胞菌内的背景表达水平很高,因此裂解基因的泄露表达造成电转入铜绿假单胞菌后无单克隆点形成。背景表达略高的质粒(Tn7 质粒,含有 RBSII)则能够成功转化入大肠杆菌内,虽然其在加入诱导剂后能够很快裂解,不过泄露表达的裂解基因极易造成细菌的自溶。对于背景表达很低的诱导系统,若诱导倍数较高,则能引起细菌的快速裂解;若诱导倍数较低,则细菌的裂解起始时间均会延长,甚至造成某些裂解基因盒子难以引发细菌裂解(图 2E)。在诱导表达量较低的情况下,细菌能否有效裂解与裂解基因盒子的裂解能力有关。

### 2.3 在铜绿假单胞菌中诱导表达裂解基因盒子及引发的裂解行为

根据对诱导系统的摸索,选择用 Tn7 载体将鼠李糖诱导系统控制表达的裂解基因盒子整合入 PAO1 基因组中,以观察这些裂解基因盒子在铜绿假单胞菌 PAO1 中引发的裂解行为的差异。在含有原始 RBS (AATGAAATTCA)的低诱导倍数表达系统中(图 4A),仅有 *LKD* 和 *LUZ* 能够引起 PAO1 的裂解,而诱导表达属于 I 型 holin 的 *S<sub>105</sub>* 及其突变体均无法引起 PAO1 的有效裂解。在添加了 RBSII (AAGAAGGAGA)的高诱导倍数表达系统中(图 4B),*S<sub>105</sub>* 与 *A52G* 也能够引起细菌的裂解,不过裂解效率并不高;而 *LKD* 和 *LUZ* 的裂解起始时间大幅提前,在 1 h 内即达到裂解稳态。上述结果表明,相同条件下,II型 holin

在 PAO1 内的裂解效率也高于 I 型 holin。我们继续测试了裂解基因盒子在稳定期铜绿假单胞菌中的裂解能力。结果如图 4C 所示, 在高  $OD_{600}$  值的菌株中加入诱导剂 30 min 内并没有引起细菌的有效裂解, 裂解效率降低; 在稀释处理后, 裂解起始时间如大肠杆菌中那样发生前移, 而 *LUZ* 的裂解效率在稀释前后始终高于 *LKD*。此外, 将过夜培养的菌液以 1:100 的比例分别稀释于 LB 和限制性 FAB 培养基中并培养至  $OD_{600}$  约为 1.0 后(图 4D), 细菌的裂解曲线没有显著的

区别, 表明营养成分的差异对裂解行为的影响较小。在起始细菌数量约为  $4 \times 10^8$  CFU/mL 的  $P_{rhaBAD}$ -RBSII-lysis cassettes-Tn7-PAO1 的各菌株内加入鼠李糖诱导诱导 10 h 后, 残存菌液的 CFU 统计结果如图 5 所示。结果显示, *C51S S76C* 的诱导表达无法使 PAO1 裂解; 诱导 *S105* 或 *A52G* 表达, 超过 99% 的 PAO1 会发生裂解; 诱导 *LKD* 或 *LUZ* 表达, 裂解效率高于前 3 种裂解基因盒子。CFU 统计结果与  $OD_{600}$  值结果一致, 这也说明了通过  $OD_{600}$  对细菌裂解能力进行表征的可靠性。

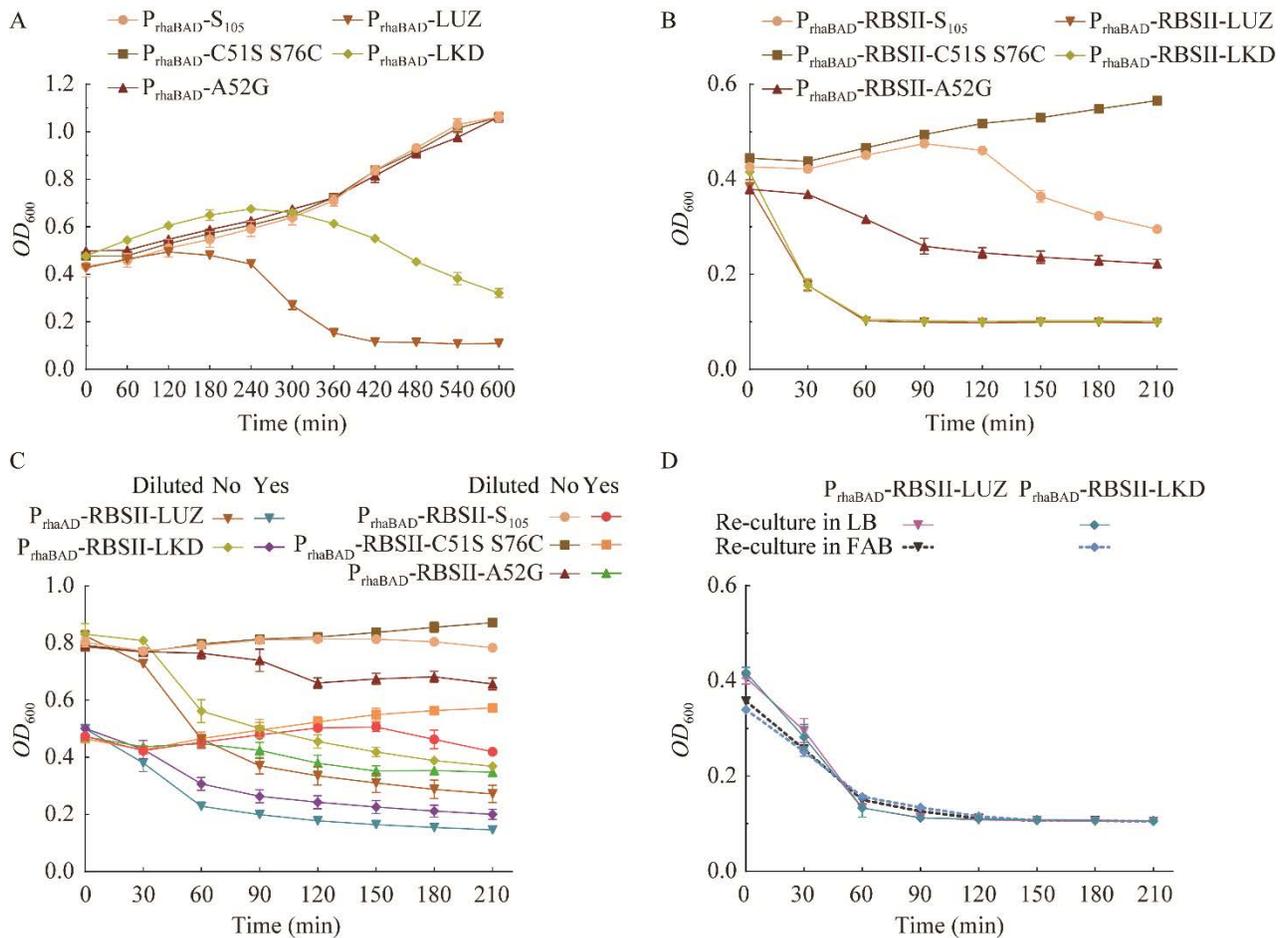


图 4 裂解基因盒子在铜绿假单胞菌中的裂解行为表征

Figure 4 Characterization of lysis behaviors of *Pseudomonas aeruginosa* strains harboring different lysis cassettes. Lysis curves of *P. aeruginosa* strains harboring plasmids ( $P_{BAD}$ -RBSII-lysis cassettes-pJN105) in different growth stages after induction with 0.1% rhamnose. A:  $OD_{600} \approx 0.5$ . B:  $OD_{600} \approx 1.0$ . C: Stationary phase and 1:1 dilution of original bacterial suspensions. D: Strains in stationary phase were diluted and re-cultured to  $OD_{600} \approx 1.0$  in fresh LB or FAB medium. All data are mean with SD arising from  $\geq 3$  replicates.

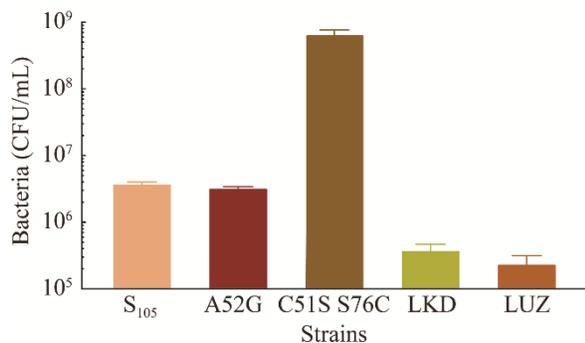


图5 每毫升菌液菌落形成单位计数统计

Figure 5 Colony forming unit (CFU) counts (per mL).

## 2.4 光控裂解的基因线路设计

我们尝试将裂解基因盒子和光遗传学工具结合, 构建可响应光进行裂解的工程化菌株。本课题组曾将可响应近红外光的光遗传学工具 BphS 用于 PAO1 胞内环鸟苷二磷酸(c-di-GMP)浓度的控制, 能够使 c-di-GMP 响应型启动子 PcdrA 在光照前后产生 10 倍左右的变化量<sup>[27]</sup>。受此启发, 首先将在 PAO1 裂解能力最强的裂解基因盒子 LUZ 放置于 PcdrA 启动子下游, 以期构建光控裂解菌株。然而, 该质粒在电转入 BphS-PAO1 菌种后没有单克隆点形成, 这表明其背景表达水平过高; 将 PcdrA-LUZ 片段整体插入 PAO1 基因组后, 由于诱导倍数较低, 光照之后未能有效引起 PAO1 裂解。

基于  $\lambda$  噬菌体表达裂解基因盒子的策略对基因线路进行了重新设计(图 6)。该基因线路的工作原理为: 工程菌接受近红外光照射后, 细菌胞内 c-di-GMP 浓度升高, 开启 Q 蛋白的表达, 当 Q 蛋白达到浓度阈值时, 可以开启 tR'下游裂解基因盒子的表达, 使工程菌裂解, 该转录终止系统已证实可应用于铜绿假单胞菌内控制基因的表达<sup>[35]</sup>。具体来说, 将 LUZ 放置于  $\lambda$  噬菌体转录终止系统 pR'-tR'下游, 在抗终止蛋白 Q 达到浓度阈值前, RNA 聚合酶难以越过终止子 tR'对下游基因进行转录<sup>[36]</sup>, 再利用 Tn7 质粒将这系统插入 PAO1 基因组中, 降低其拷贝数。希望通过这两种策略降低裂解基因的背景表达量, 避免细菌的提前裂解。将抗终止蛋白 Q 放置于 PcdrA 启动子下游, 同时在 Q 蛋白的 N 端添加 SsrA 蛋白水解标签 ASV<sup>[12]</sup>, 以降低未诱导时 Q 蛋白在胞内的累积浓度。

## 2.5 可光控黏附指定表面及裂解的菌株筛选

光遗传学工具能够以极高的时空分辨率控制基因的表达<sup>[37]</sup>, 但是也会受到基因背景表达的干扰。PAO1 的黏附行为与 c-di-GMP 浓度密切相关<sup>[38]</sup>, 细菌胞内的 c-di-GMP 浓度升高, 细菌倾向于进行表面黏附, 并产生大量胞外聚合物<sup>[39]</sup>; 当 c-di-GMP 浓度降低时, 细菌容易从表面脱附。本课题组曾在 PAO1 中引入光遗传学工具

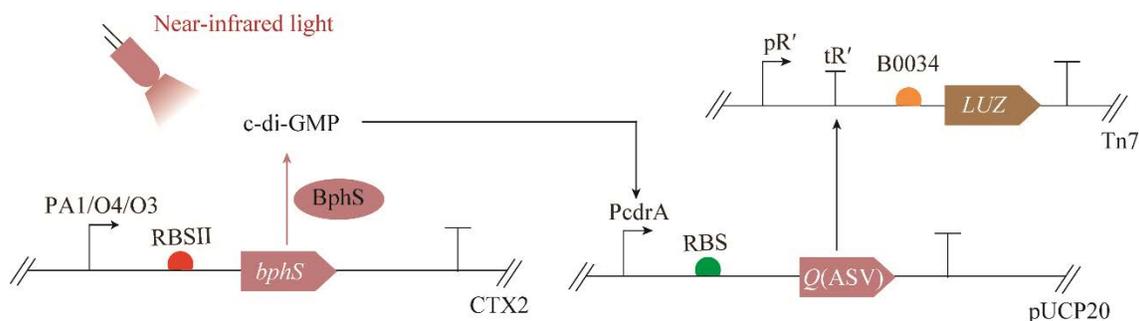


图6 光控铜绿假单胞菌裂解的基因线路设计

Figure 6 Genetic circuit design for optogenetic control of lysis behavior of *Pseudomonas aeruginosa*.

BphS 进行生物打印<sup>[27]</sup>, 然而背景表达水平的 c-di-GMP 即可使 PAO1 黏附于玻璃表面, 从而难以进行高分辨率的生物打印。虽然通过引入蓝光响应的磷酸二酯酶可在光照时有效分解 c-di-GMP, 使细菌难以黏附在蓝光照射的表面, 不过这一方法增加了系统的复杂程度及控制难度。通过持续性表达适量水平的磷酸二酯酶 PA2133<sup>[40]</sup>, 降低细菌胞内的 c-di-GMP 浓度, 有望抑制其表面黏附能力。结果证实, 通过基因组插入的方式持续性表达 PA2133, 可以显著降低 PAO1 的表面黏附能力(图 7)。在未光照且细菌的初始黏附量相当的情况下, 未表达 PA2133 的 BphS-PAO1 菌株, 在表面黏附的数量逐渐增加, 大约 6 h 后表面细菌的数量即达到初始数量的 3 倍; 持续表达 PA2133 的 BphS-PA2133-PAO1 菌株, 40 min 后在表面的黏附数量即迅速下降至不足初始数量的 50%, 3 h 后则几乎没有细菌黏附表面。我们将前期设计好的裂解模块与 c-di-GMP 分解模块通过 miniTn7 质粒同时插入 PAO1 基因组中, 即得到在非光照条件下难以在

表面黏附的底盘菌株 BphS-LUZ-PAO1。

采用原始的 PcdrA 启动子和核糖体结合位点(RBS)表达抗终止蛋白 Q, 进行可光控裂解菌株的构建和筛选。多次重复实验后, 发现含有该质粒的 BphS-LUZ-PAO1 菌株在光照时裂解效率较低, 表明这套光控裂解系统的诱导表达水平较低。转录和翻译对基因的表达量有着重要的影响, 其分别与启动子和 RBS 的强度有关。考虑到对 PcdrA 启动子进行突变和筛选的复杂性, 而前期的实验也证实了通过调整 RBS 的强度也可以有效调整诱导系统的诱导倍数。我们使用不同强度的 RBS 对原始 RBS 进行替换, 从翻译层次上调控 Q 蛋白的诱导表达水平。将待筛选菌株培养到  $OD_{600}$  约为 1.0 后, 滴加不同体积的菌液于琼脂板上, 随后施加持续光照, 通过菌斑的生长情况对细菌的裂解能力进行评估。结果如图 8A 所示, 菌株 Q16 在光照 48 h 的时间内, 琼脂板上没有单克隆点形成, 表明 Q16 有极好的光响应裂解能力, 而其他菌株则有可见的菌斑长出, 说明其裂解不充分。我们还统计了微流装置内

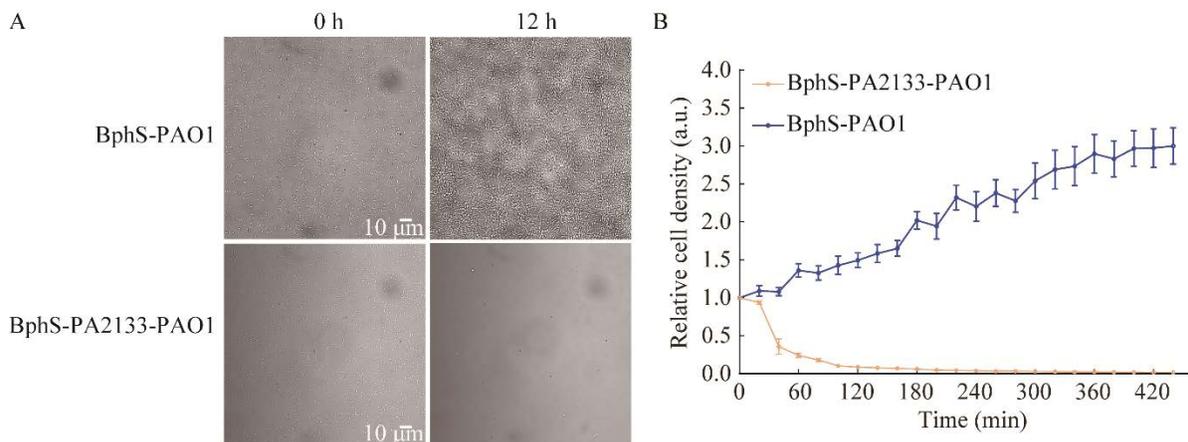


图 7 过表达 PA2133 对铜绿假单胞菌的表面黏附能力的影响

Figure 7 The influence of over-expressed PA2133 on surface adhesion capacities of *Pseudomonas aeruginosa*. A: Representative BF images of BphS-PAO1 and BphS-PA2133-PAO1 in microfluidic devices at 0 h and 12 h. Scale bars=10 μm. B: Relative cell densities (current cell numbers/initial cell numbers) of BphS-PAO1 and BphS-PA2133-PAO1 attached to surfaces over time without light. All data are mean with SD arising from 3 replicates.

玻璃表面细菌的数量,对 Q16 的裂解行为进行更精确地表征(图 8B)。结果显示,在接受平均光强为  $50 \mu\text{W}/\text{cm}^2$  的近红外光照射时,细菌在光照 150 min 之前,仍然可以在表面粘附和生长,表面细菌数量逐渐增多;而光照约 150 min 后,细菌开始缓慢裂解,表面细菌数量逐渐降低。上述结果表明, Q16 拥有响应光裂解的能力,且裂解效率极高。

## 2.6 光控可裂解菌株修饰表面

工程化菌株 Q16 具有在指定表面黏附并裂解的能力。通过控制程序对指定视野施加近红外光照射后,由于裂解起始时间和施加光照的时间相比存在 3–4 h 的延迟,在这段时间内, Q16 即能够在表面黏附并产生多种胞外聚合物,即完成对光照视野区域内的表面修饰,而非光照视野由于细菌难以黏附,因此表面没有胞外聚合物的修饰。细菌则在裂解开启后从体系中移除(图 9A),增加了系统的生物安全性。从时序性明场显微镜图片中可以看出,在光照的前 3 h 内,表面细菌数

量逐渐增加;在光照 4 h 后,表面开始有细菌的裂解残渣出现,细菌开始裂解;光照 7 h 后,表面出现大量细菌残渣,而存活的细菌数量非常少。

胞外多糖 psl 是帮助 PAO1 在生物表面或非生物表面黏附的主要物质之一,其主要成分包括甘露糖、葡萄糖和鼠李糖<sup>[41]</sup>。在微流通道中,选择相邻的 8 组视野进行光照控制,其中 4 组视野不施加光照,而另外 4 组视野施加约  $50 \mu\text{W}/\text{cm}^2$  的近红外光照射,实验结束后加入 cy5-甘露糖染料对甘露糖进行染色实验,探究是否有胞外多糖存在于细菌黏附并裂解的表面,结果如图 9B 所示。可以看出,在光照视野的表面上,可由 cy5-甘露糖染料检测到大量甘露糖的存在,而在避光视野中,则几乎没有甘露糖的存在。上述结果表明甘露糖只存在于光照的表面,而避光表面由于细菌难以黏附,并没有甘露糖的存在。这样,本研究利用可光控裂解的菌株 Q16,通过具有高空间分辨率的光照控制,实现了对玻璃表面的高空间分辨率修饰。

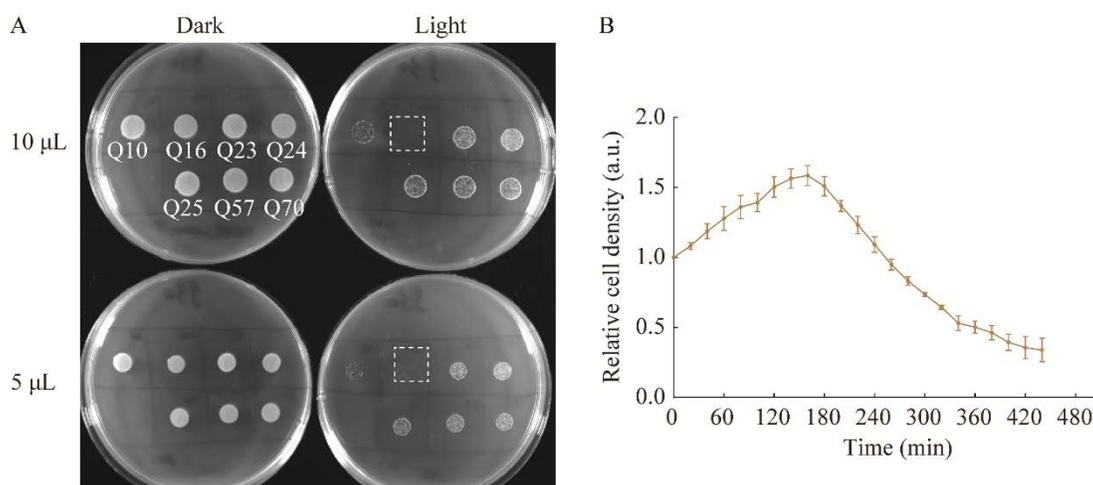


图 8 可光控裂解的铜绿假单胞菌菌株的筛选

Figure 8 Screen for *Pseudomonas aeruginosa* strains capable of lysis after illumination. A: Colony morphologies of candidate strains that are capable of lysis after illumination with NIR light. B: Relative cell densities of Q16 in microfluidic devices over time.

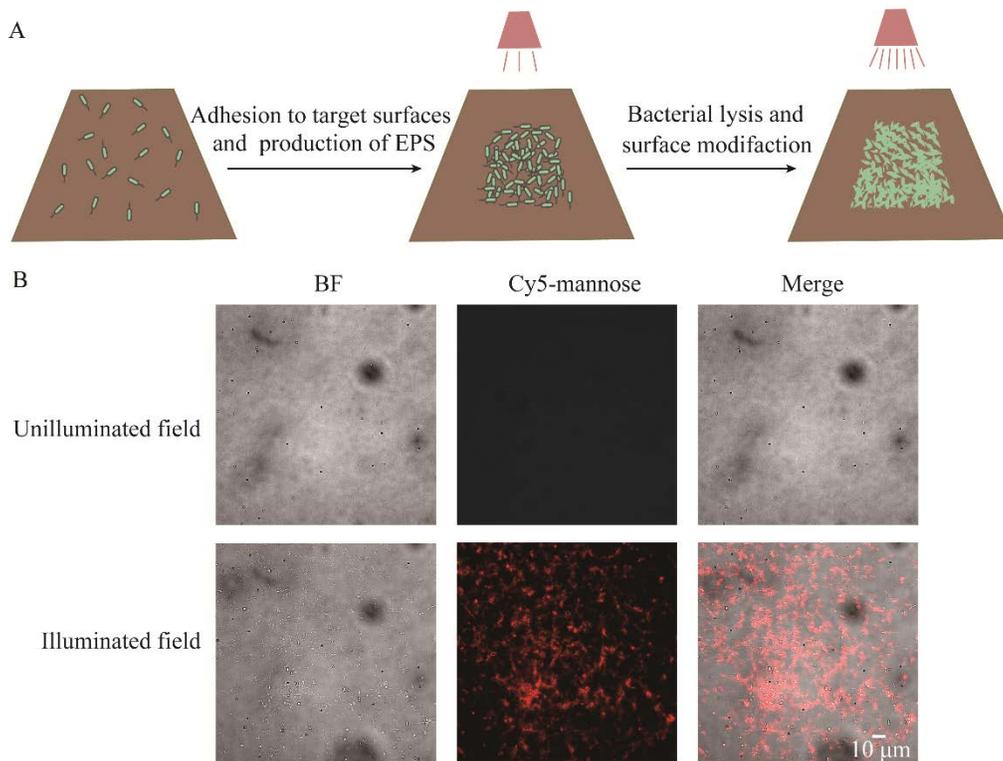


图9 光控细菌裂解对指定表面进行修饰

Figure 9 Optogenetic manipulation of bacterial lysis for target surface modification. A: Schematic illustration of light-induced bacterial lysis on target surface and surface modification. B: BF, fluorescence and merged images of glass surface after light-induced production of EPS and bacterial lysis. Red: cy5-mannose. Scale bar=10  $\mu\text{m}$ .

### 3 讨论与结论

本研究通过阿拉伯糖和鼠李糖诱导系统,分析了若干裂解基因盒子在大肠杆菌和铜绿假单胞菌中所引发裂解行为的差异。结果表明:(1)在大肠杆菌中,含有 *LKD* 和 *LUZ* 的菌株在高诱导表达量的系统中引发的裂解行为相似,而在低诱导表达系统中, *LKD* 的裂解效率大大降低,而 *LUZ* 依然保持较高的裂解效率,表明 *LUZ* 是一种更强的裂解基因; *S<sub>105</sub>* 在加入诱导剂后存在明显的裂解延迟,但裂解开始后很快便进入稳态,而 *A52G* 和 *C51S S76C* 则能够快速引起细菌的持续裂解。(2)在铜绿假单胞菌中,诱导倍数不

足的情况下, I型 *holin* 难以引起铜绿假单胞菌的裂解, II型 *holin* 所需的裂解起始时间也大幅增加;在高诱导倍数的系统中, I型 *holin* 中的 *S<sub>105</sub>* 和 *A52G* 也能够引起细菌裂解,不过裂解起始时间显著晚于 *LKD* 和 *LUZ*,且裂解效率不高,而 *C51S S76C* 仍旧难以引起铜绿假单胞菌裂解。我们还发现,含有 II型 *holin* 的菌株裂解效率一般高于含有 I型 *holin* 的菌株,不过其在稳定期的裂解起始时间较晚且裂解速度较慢,而通过稀释的方法,可以有效地使菌株的裂解行为恢复至与对数期大致相当。

通过添加小分子诱导物诱导细菌裂解是目前绝大多数基因线路中都采用的方式<sup>[42-44]</sup>,不过

小分子诱导有其明显的劣势,包括依赖扩散、不可逆、某些诱导剂价格昂贵等,限制了其应用。因此,新型的细菌裂解诱导方式的开发是十分必要的。本研究中基于 *LUZ* 裂解基因盒子和光遗传学工具 *BphS* 构建的具有光控诱导裂解功能的工程化菌株,为摆脱传统裂解方式对小分子诱导物的依赖提供了思路。虽然通过光照控制细菌的裂解行为并非首次提出<sup>[45]</sup>,不过我们设计的基因回路不仅实现了对裂解能力的控制,同时实现了对黏附功能的控制,拥有更丰富的功能。与传统的表面修饰方法相比,通过工程菌进行表面修饰,不需要对表面进行预处理,具有一定的应用前景。以本研究为基础,可以从以下方面开展进一步的工作:(1) 细菌在粘附表面上形成的 EPS 中含有丰富的基团,这些有望成为可功能化修饰的位点;(2) 许多凝集素可以和 EPS 中的多糖结合<sup>[46]</sup>,如果利用工程菌生产与凝集素融合的功能蛋白,将有望实现“功能蛋白合成-胞外聚合物产生并表面修饰-蛋白释放并固定-细菌移除”的高时空分辨率的原位一体化表面修饰;(3) 由于铜绿假单胞菌可在多种表面产生黏附,因此可继续探究对其他表面进行修饰的可能。当然,我们也注意到了这种修饰方法的不均匀性,主要原因是光照时间不久后细菌便开始裂解,表面黏附的细菌数量不足。如果可以增加新的控制元件对黏附行为和裂解行为进行解耦,或者使用类似 *S<sub>105</sub>* 这类有较长延迟时间的裂解基因盒子,或许可以解决这个问题。

裂解基因盒子作为一种极其特殊的“毒性蛋白”,需要采用严谨型的诱导系统控制其背景表达,以降低其泄露表达对宿主的损伤。一般来说,由于诱导系统均存在背景表达量,而随着拷贝数的增加,这种背景表达量会被放大,因而拷贝数越大则相应的背景表达量也会越高,因此低拷贝载体或者基因组表达是进行裂解基因功能构建

的优选策略。而在添加诱导剂后,又需要裂解蛋白达到一定的诱导表达水平,才能够使宿主有效裂解,因此,表达裂解基因的理想诱导系统需要足够低的背景表达量和足够高的诱导表达量。许多诱导系统在模式菌株例如大肠杆菌和沙门氏菌中,已做过详细的表征,因此基于这些诱导系统可以方便地构建出不同的裂解系统<sup>[15-16]</sup>。我们的研究表明,不同的诱导系统在不同的载体中表达、用相同的载体在不同的宿主中表达或者简单地调节 RBS 强度,都会使诱导系统的性质产生巨大的差异。将已有的诱导系统移植到非模式菌株中,若其诱导表达量水平较低,可能无法诱导细菌的裂解;而如果背景表达量过高,可能造成细菌的自溶或者无法成功构建菌株。因此,对于非模式菌株而言,由于缺少对诱导系统的系统表征,在不同的宿主内构建裂解系统仍是一个巨大的挑战。

除了诱导系统,裂解基因盒子本身裂解能力的差异也是裂解系统构建的一大关键考虑因素。以本研究中涉及的 5 种裂解基因盒子为例,在高诱导表达下,其都能够引起细菌裂解,不过裂解行为有一定的差异;在低诱导表达下,某些裂解基因盒子裂解效率较低甚至难以引起宿主的裂解。高诱导倍数系统的开发是一项复杂的工作<sup>[47]</sup>,大多数现有诱导系统的诱导幅度远低于本研究所使用的阿拉伯糖或鼠李糖诱导系统。当与低诱导倍数的诱导系统联合使用时,需要使用裂解能力强的裂解基因盒子以完成可裂解菌株的构建。因此,未来在其他宿主内开发与表征更多高效的裂解基因盒子,对于合成生物学工具箱的进一步拓展是十分必要的。

## REFERENCES

- [1] TANG TC, AN BL, HUANG YY, VASIKARAN S, WANG YY, JIANG XY, LU TK, ZHONG C. Materials design by synthetic biology[J]. Nature Reviews Materials,

- 2021, 6(4): 332-350.
- [2] SMANSKI MJ, ZHOU H, CLAESEN J, SHEN B, FISCHBACH MA, VOIGT CA. Synthetic biology to access and expand nature' chemical diversity[J]. *Nature Reviews Microbiology*, 2016, 14(3): 135-149.
- [3] LV XQ, WU YK, GONG MY, DENG JY, GU Y, LIU YF, LI JH, DU GC, LEDESMA-AMARO R, LIU L, CHEN J. Synthetic biology for future food: research progress and future directions[J]. *Future Foods*, 2021, 3: 100025.
- [4] TAN X, LETENDRE JH, COLLINS JJ, WONG WW. Synthetic biology in the clinic: engineering vaccines, diagnostics, and therapeutics[J]. *Cell*, 2021, 184(4): 881-898.
- [5] HAMMER K, MIJAKOVIC I, JENSEN PR. Synthetic promoter libraries-tuning of gene expression[J]. *Trends in Biotechnology*, 2006, 24(2): 53-55.
- [6] SALIS HM. The ribosome binding site calculator[A]//*Methods in Enzymology*[M]. Amsterdam: Elsevier, 2011: 19-42.
- [7] CHEN YJ, LIU P, NIELSEN AAK, BROPHY JAN, CLANCY K, PETERSON T, VOIGT CA. Characterization of 582 natural and synthetic terminators and quantification of their design constraints[J]. *Nature Methods*, 2013, 10(7): 659-664.
- [8] LOU CB, STANTON B, CHEN YJ, MUNSKY B, VOIGT CA. Ribozyme-based insulator parts buffer synthetic circuits from genetic context[J]. *Nature Biotechnology*, 2012, 30(11): 1137-1142.
- [9] LINDNER F, DIEPOLD A. Optogenetics in bacteria-applications and opportunities[J]. *FEMS Microbiology Reviews*, 2022, 46(2): fuab055.
- [10] CONG L, RAN FA, COX D, LIN SL, BARRETTO R, HABIB N, HSU PD, WU XB, JIANG WY, MARRAFFINI LA, ZHANG F. Multiplex genome engineering using CRISPR/Cas systems[J]. *Science*, 2013, 339(6121): 819-823.
- [11] SCHUSTER LA, REISCH CR. A plasmid toolbox for controlled gene expression across the Proteobacteria[J]. *Nucleic Acids Research*, 2021, 49(12): 7189-7202.
- [12] ANDERSEN JB, STERNBERG C, POULSEN LK, BJORN SP, GIVSKOV M, MOLIN S. New unstable variants of green fluorescent protein for studies of transient gene expression in bacteria[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 1998, 64(6): 2240-2246.
- [13] NGUYEN PQ, BOTYANSZKI Z, TAY PKR, JOSHI NS. Programmable biofilm-based materials from engineered curli nanofibres[J]. *Nature Communications*, 2014, 5: 4945.
- [14] HUANG JF, LIU SY, ZHANG C, WANG XY, PU JH, BA F, XUE S, YE HF, ZHAO TX, LI K, WANG YY, ZHANG JC, WANG LH, FAN CH, LU TK, ZHONG C. Programmable and printable *Bacillus subtilis* biofilms as engineered living materials[J]. *Nature Chemical Biology*, 2019, 15(1): 34-41.
- [15] GAO YQ, FENG XJ, XIAN M, WANG Q, ZHAO G. Inducible cell lysis systems in microbial production of bio-based chemicals[J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2013, 97(16): 7121-7129.
- [16] HWANG IY, KOH E, WONG A, MARCH JC, BENTLEY WE, LEE YS, CHANG MW. Engineered probiotic *Escherichia coli* can eliminate and prevent *Pseudomonas aeruginosa* gut infection in animal models[J]. *Nature Communications*, 2017, 8: 15028.
- [17] DIN MO, DANINO T, PRINDLE A, SKALAK M, SELIMKHANOV J, ALLEN K, JULIO E, ATOLIA E, TSIMRING LS, BHATIA SN, HASTY J. Synchronized cycles of bacterial lysis for *in vivo* delivery[J]. *Nature*, 2016, 536(7614): 81-85.
- [18] CHOWDHURY S, CASTRO S, COKER C, HINCHLIFFE TE, ARPAIA N, DANINO T. Programmable bacteria induce durable tumor regression and systemic antitumor immunity[J]. *Nature Medicine*, 2019, 25(7): 1057-1063.
- [19] BORRERO-de ACUÑA JM, HIDALGO-DUMONT C, PACHECO N, CABRERA A, POBLETE-CASTRO I. A novel programmable lysozyme-based lysis system in *Pseudomonas putida* for biopolymer production[J]. *Scientific Reports*, 2017, 7: 4373.
- [20] CHU T, GUAN LY, SHANG PF, WANG QY, XIAO JF, LIU Q, ZHANG YX. A controllable bacterial lysis system to enhance biological safety of live attenuated *Vibrio anguillarum* vaccine[J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2015, 45(2): 742-749.
- [21] PARK SY, LEE JY, CHANG WS, CHOY HE, KIM GJ. A coupling process for improving purity of bacterial minicells by holin/lysin[J]. *Journal of Microbiological Methods*, 2011, 86(1): 108-110.
- [22] JUHAS M, AJIOKA JW. T7RNA polymerase-driven inducible cell lysis for DNA transfer from *Escherichia coli* to *Bacillus subtilis*[J]. *Microbial Biotechnology*, 2017, 10(6): 1797-1808.
- [23] YOUNG R. Phage lysis: do we have the hole story yet?[J]. *Current Opinion in Microbiology*, 2013, 16(6): 790-797.
- [24] RYU MH, GOMELSKY M. Near-infrared light responsive synthetic c-di-GMP module for optogenetic applications[J]. *ACS Synthetic Biology*, 2014, 3(11): 802-810.
- [25] CHOI KH, SCHWEIZER HP. Mini-Tn7 insertion in bacteria with single *attTn7* sites: example *Pseudomonas aeruginosa*[J]. *Nature Protocols*, 2006, 1(1): 153-161.
- [26] ZHANG RR, XIA AG, NI L, LI FX, JIN ZY, YANG S, JIN F. Strong shear flow persisters bacteria resist mechanical washings on the surfaces of various polymer materials[J]. *Advanced Biosystems*, 2017, 1(12):

- e1700161.
- [27] HUANG YJ, XIA AG, YANG G, JIN F. Bioprinting living biofilms through optogenetic manipulation[J]. ACS Synthetic Biology, 2018, 7(5): 1195-1200.
- [28] GRÜNDLING A, BLÄSI U, YOUNG R. Genetic and biochemical analysis of dimer and oligomer interactions of the lambda S holin[J]. Journal of Bacteriology, 2000, 182(21): 6082-6090.
- [29] GRÜNDLING A, MANSON MD, YOUNG R. Holins kill without warning[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2001, 98(16): 9348-9352.
- [30] CEYSSENS PJ, LAVIGNE R, MATTHEUS W, CHIBEU A, HERTVELDT K, MAST J, ROBBEN J, VOLCKAERT G. Genomic analysis of *Pseudomonas aeruginosa* phages LKD16 and LKA1: establishment of the phiKMV subgroup within the T7 supergroup[J]. Journal of Bacteriology, 2006, 188(19): 6924-6931.
- [31] LAVIGNE R, LECOUTERE E, WAGEMANS J, CENENS W, AERTSEN A, SCHOOF L, LANDUYT B, PAESHUYSE J, SCHEER M, SCHOBERT M, CEYSSENS PJ. A multifaceted study of *Pseudomonas aeruginosa* shutdown by virulent podovirus LUZ19[J]. mBio, 2013, 4(2): e00061-00013.
- [32] MEISNER J, GOLDBERG JB. The *Escherichia coli* rhaSR-PrhaBAD inducible promoter system allows tightly controlled gene expression over a wide range in *Pseudomonas aeruginosa*[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2016, 82(22): 6715-6727.
- [33] WHITE R, CHIBA S, PANG T, DEWEY JS, SAVVA CG, HOLZENBURG A, POGLIANO K, YOUNG R. Holin triggering in real time[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2011, 108(2): 798-803.
- [34] CHOI KH, GAYNOR JB, WHITE KG, LOPEZ C, BOSIO CM, KARKHOFF-SCHWEIZER RR, SCHWEIZER HP. A Tn7-based broad-range bacterial cloning and expression system[J]. Nature Methods, 2005, 2(6): 443-448.
- [35] KHAN JA, GUSS AM, KAO KC. Enhancing transcription in *Escherichia coli* and *Pseudomonas putida* using bacteriophage lambda anti-terminator protein Q[J]. Biotechnology Letters, 2022, 44(2): 253-258.
- [36] SANTANGELO TJ, ARTSIMOVITCH I. Termination and antitermination: RNA polymerase runs a stop sign[J]. Nature Reviews Microbiology, 2011, 9(5): 319-329.
- [37] BAUMSCHLAGER A, KHAMMASH M. Synthetic biological approaches for optogenetics and tools for transcriptional light-control in bacteria[J]. Advanced Biology, 2021, 5(5): e2000256.
- [38] JENAL U, REINDERS A, LORI C. Cyclic di-GMP: second messenger extraordinaire[J]. Nature Reviews Microbiology, 2017, 15(5): 271-284.
- [39] SAUER K, STOODLEY P, GOERES DM, HALL-STOODLEY L, BURMØLLE M, STEWART PS, BJARNSHOLT T. The biofilm life cycle: expanding the conceptual model of biofilm formation[J]. Nature Reviews Microbiology, 2022, 20(10): 608-620.
- [40] KULESEKARA H, LEE V, BRENCIC A, LIBERATI N, URBACH J, MIYATA S, LEE DG, NEELY AN, HYODO M, HAYAKAWA Y, AUSUBEL FM, LORY S. Analysis of *Pseudomonas aeruginosa* diguanylate cyclases and phosphodiesterases reveals a role for bis-(3'-5')-cyclic-GMP in virulence[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2006, 103(8): 2839-2844.
- [41] FLEMMING HC, WINGENDER J. The biofilm matrix[J]. Nature Reviews Microbiology, 2010, 8(9): 623-633.
- [42] WONG CFA, van VLIET L, BHUJBAL SV, GUO CZ, SLETMOEN M, STOKKE BT, HOLLFELDER F, LALE R. A titratable cell lysis-on-demand system for droplet-compartmentalized ultrahigh-throughput screening in functional metagenomics and directed evolution[J]. ACS Synthetic Biology, 2021, 10(8): 1882-1894.
- [43] MA Y, ZHU WJ, ZHU GS, XU Y, LI SY, CHEN R, CHEN LD, WANG JF. Efficient robust yield method for preparing bacterial ghosts by *Escherichia coli* phage ID52 lysis protein E[J]. Bioengineering: Basel, Switzerland, 2022, 9(7): 1-21.
- [44] WON G, HAJAM IA, LEE JH. Improved lysis efficiency and immunogenicity of *Salmonella ghosts* mediated by co-expression of  $\lambda$  phage holin-endolysin and  $\phi$ X174 gene E[J]. Scientific Reports, 2017(1), 1-12.
- [45] WANG GY, LU X, ZHU YS, ZHANG W, LIU JH, WU YK, YU LY, SUN DC, CHENG F. A light-controlled cell lysis system in bacteria[J]. Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology, 2018, 45(6): 429-432.
- [46] STRATHMANN M, WINGENDER J, FLEMMING HC. Application of fluorescently labelled lectins for the visualization and biochemical characterization of polysaccharides in biofilms of *Pseudomonas aeruginosa*[J]. Journal of Microbiological Methods, 2002, 50(3): 237-248.
- [47] LI X, ZHANG CC, XU XP, MIAO J, YAO J, LIU RM, ZHAO YZ, CHEN XJ, YANG Y. A single-component light sensor system allows highly tunable and direct activation of gene expression in bacterial cells[J]. Nucleic Acids Research, 2020, 48(6): e33.

(本文责编 陈宏宇)